Fluoreszenzoptische Untersuchungen bei der Phagocytose von Enterokokken durch segmentkernige neutrophile Granulocyten

Artur Schleich

1979

AUS DER KINDERPOLIKLINIK DER UNIVERSITÄT MÜNCHEN
Direktor: Prof. Dr. H. SPIESS

FLUORESZENZOPTISCHE UNTERSUCHUNGEN BEI DER PHAGOCYTOSE VON ENTEROKOKKEN DURCH SEGMENTKERNIGE NEUTROPHILE GRANULOCYTEN

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Artur S c h l e i c h
aus München

München 1978

Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter:	Prof. Dr. H. J. SUSCHKE
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. H. SPIESS
Dekan:	Prof. Dr. W. SPANN

Tag der mündlichen Prüfung: 18.12.1979

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

INHALTSVERZEICHNIS

I. Einleitung

II. Problemstellung

III. Eigene Untersuchungen

1. Geräte, Material

2. Versuchsablauf

3. Patientengut

4. Versuchsergebnisse

4.1. Phagocytoseverhalten von segmentkernigen neutrophilen Granulocyten mit Enterokokken

4.2. Enterokokkenabtötungstest

4.3. Darstellung der cytoplasmatischen Granula von segmentkernigen neutrophilen Granulocyten

4.4. Vergleich der Morphologie nicht-phagocytierter und phagocytierter Enterokokken

IV. Diskussion

V. Zusammenfassung

VI. Literaturnachweis

VII. Lebenslauf

I. Einleitung

Der menschliche Organismus besitzt zum Schutz gegen Infektionen durch Bakterien, Pilze oder Viren einerseits humorale und zelluläre spezifische Abwehrmechanismen (Immunsystem), andererseits humorale und zelluläre unspezifische Abwehrmechanismen. Die Phagocytosefähigkeit von Leukocyten und Reticulumzellen des RES ist die Grundlage der zellulären unspezifischen Abwehr. Die Fähigkeit bestimmter Blutzellen, Partikel in sich aufzunehmen, zu phagocytieren, wurde bereits 1883 von Metschnikoff(16) entdeckt. Seither wird vielfach in der Literatur unter Phagocytose das gesamte komplexe Geschehen von der gezielten Bewegung der Zelle bis zur vollständigen Abtötung eines Keimes verstanden. Es erscheint jedoch sinnvoller, die Phagocytose als einen Teilschritt der gesamten Abwehr anzusehen, die bestimmten Gesetzmäßigkeiten unterliegt und in 6 Stadien unterteilt wird(19).

Chemotaxis

In das Gewebe eingedrungene Bakterien setzen Substanzen frei, die zusammen mit aus dem Gewebe selbst abgegebenen Stoffen einen chemotaktischen Reiz auf die Granulocyten und Monocyten ausüben. Dies führt zu einer Wanderung der Granulocyten aus den Gefäßen in das infizierte Gewebe in Form einer gerichteten Migration.

Opsonierung und Fixierung der Keime an die Granulocytenmembran

Bevor die Zelle die Bakterien in sich aufnehmen kann, werden diese zunächst an die Zellmembran angelagert. Dazu sind im Serum nachweisbare Substanzen notwendig, die als Opsonine bezeichnet werden. Der Vorgang der Opsonierung scheint für die Phagocytose der Bakterien unabdingbare Voraussetzung zu sein.

Phagocytose

Die an der Membran fixierten Bakterien werden von Pseudopodien umschlossen. Gleichzeitig stülpt sich ein Teil der Membran nach innen und bildet eine Vakuole, genannt Phagosom. Ein Granulocyt ist in der Lage, zahlreiche Bakterien zu phagocytieren, wobei sowohl mehrere Bakterien in einer Vakuole liegen können, als auch eine Zelle mehrere Phagosome enthalten kann. Akute Entzündungen scheinen die Bildung von Vakuolen und die Ingestion von Partikeln zu stimulieren.

Degranulierung

Schon wenige Minuten nach der Ingestion der Bakterien lagern sich neutrophile Granula an die Vakuolenmembran an, beide verschmelzen miteinander und der Inhalt der Granula ergießt sich in die Vakuole.

Abtötung der Bakterien

Während der Phagocytose werden eine Reihe von Stoffwechselschritten aktiviert, die letztendlich zusammen mit dem Inhalt der Granula zur Abtötung der Bakterien führen. Im Elektronenmikroskop wird die Struktur der Bakterien aufgelockert, während gleichzeitig die Granula verschwinden.

Tod der Granulocyten

Im weiteren Verlauf folgt unabwendlich der Untergang der phagocytierenden Zellen. Die Vakuole wird undicht und entleert ihren Inhalt in den Granulocyten, der dadurch zerstört wird. Dieser Untergang führt dann erneut zur Freisetzung chemotaktisch wirkender Substanzen, was die weitere Anlockung von Granulocyten zur Folge hat.

Neben dem physiologischen Ablauf der Infektabwehr kennt man auch verschiedene angeborene(19) oder erworbene(20) Defekte in jedem der 6 Stadien dieses Geschehens, die sich klinisch entweder nur in allgemein erhöhter Infektanfälligkeit äußern(27) oder so schwere Krankheitsbilder wie die progressive septische Granulomatose des Kindesalters(12) und andere(19,24) zur Folge haben.

II. Problemstellung

Ziel dieser A rbeit ist es, mit Hilfe der relativ einfachen Methode der Fluoreszenzmikroskopie den physiologischen Ablauf bzw. pathologisch gestörte Abläufe einiger Stadien der zellulären unspezifischen Infektabwehr zu erkennen und die dem physiologischen Ablauf bzw. pathologisch gestörten Abläufen entsprechenden morphologischen Korrelate zu beschreiben.
Besonders berücksichtigt wird dabei das Phagocytoseverhalten von segmentkernigen neutrophilen Granulocyten mit Enterokokken, die fluoreszenzoptische Unterscheidung von 2 Granulatypen in segmentkernigen neutrophilen Granulocyten und die Darstellung von Verdauungserscheinungen an phagocytierten Enterokokken.

III. Eigene Untersuchungen

1. Geräte und Material

1.1. Fluoreszenz und Fluoreszenzmikroskop

Das Prinzip der Fluoreszenzanregung und der daraus entstandenen Fluoreszenzmikroskopie wurde 1975 in der Diss. von Keller ausführlich abgehandelt(13).

1.2. Färbung und Farbstoff

a) Färbegang:

Fixation mit Methanol	2 Min.
Abkippen des überschüssigen MeOH	
Trocknung mit Kleenex-Tüchern	
Färbung mit PIC-Cl-Färbelösung	30 Min.
Abkippen der überschüssigen PIC-Cl-Färbelösung	
Trocknung mit Kleenex-Tüchern	

b) Pseudoisocyanin(PIC):

PIC-Cl-Färbelösung: 500µmolare PIC-Cl-Lösung + Pufferlösung Merck Art. 9460 ph 8,0 im Verhältnis 1:1

Die chemische Struktur von PIC, seine Fluoreszenzbanden und die Vorgänge bei der Färbung mit PIC sind in der Diss. von Keller ausführlich dargestellt(13).

Die Fluoreszenz von segmentkernigen neutrophilen Granulocyten(SNG) und Enterokokken in PIC-gefärbten Blutausstrichen ist die Grundlage der Versuchsauswertung mit dem Fluoreszenzmikroskop.

1.3. Bakterien

Alle Versuche werden mit ß-hämolysierenden Streptokokken der Gruppe D, synonym Enterokokken(EK) oder Streptococcus faecalis, durchgeführt.

Zur Enterokokkenzüchtung wird eine trypticase Bouillon verwendet, die folgende Zusammensetzung /l hat:

Tryptisch verdautes Casein	17,0 g
Durch Papain verdautes Sojabohnenmehl	3,0 g
NaCl	5,0 g
K_2HPO_4	2,5 g
Traubenzucker	2,5 g
pH	ca. 7,3

Der Enterokokkenabtötungstest wird mit flüssigem Nähragar und Petrischalen von 9cm Ø durchgeführt.

2. Versuchsablauf

2.1. Enterokokkenzüchtung

Eine trypticase Bouillon wird mit EK vom Schragagar beimpft und 18 h bei 37° C inkubiert.

2.2. Enterokokkenzahlung

Nach 18 h kraftiges Aufschütteln der Bouillon. Ein Eppendorfreaktionsgefäß, gefüllt mit dieser EK-Bouillon-Mischung(EKBM), wird zur Aufrechterhaltung der homogenen Verteilung der EK in einen Rüttler gestellt; daraus später Entnahme entsprechender Mengen EKBM für die Versuchsansätze.
Verdünnung eines Teiles der EKBM 1:1ooo mit phys. NaCl.
Füllung einer Neubauer-Zahlkammer mit 1oµl der Verdünnung, mikroskopieren mit Zeiss-Mikroskop 4o687 bei Phasenkontrast 2, Helligkeit 3V, bei 4o-facher Vergrößerung.

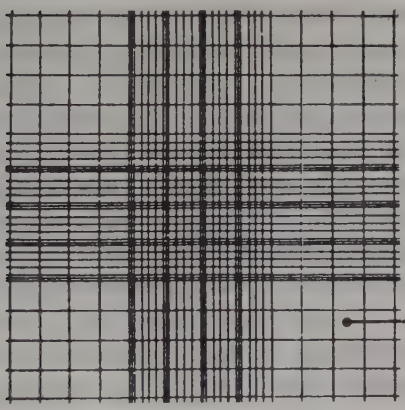

Abb. 1: Zählnetz einer Neubauer-Zählkammer

Zählung der EK in 32 großen Eckquadraten, dabei zeitliche Doppelbestimmung nach 2 Min..
Danach Berechnung der EK-Zahl/ml EKBM.

Der Durchschnittswert EK/großes Eckquadrat entspricht der Zahl der EK in $^1/_{16}0\mu l$ der Verdünnung.

2.3. Blutentnahme

Sie erfolgt aus einer Armvene, 5 E Heparin/ml Vollblut. Gleichzeitig wird ein Differentialblutbild erstellt.

2.4. Versuchsansatz(VA)

Je Patienten-(Vergleichspersonen-) blut 1 Leerwert(A) und 2 Testansätze(B,C) in Eppendorfreaktionsgefäßen.

VA	A: 1ml Heparinvollblut(von Patient bzw. Vergleichspers.)	ohne EKBM
VA	B: (1ml-xμl) " "	+xμl EKBM
VA	C: (1ml- $\frac{x}{2}\mu$l) " "	+$\frac{x}{2}\mu$l EKBM

In Testansatz B werden $20\mu l \leq x \leq 60\mu l$ EKBM (20 bis 24 Mio. EK) pipettiert, in Testansatz C entsprechend die Hälfte davon. In einem Versuch war die anfangliche EK-Zahl in Testansatz B 32 Mio.. Das Blut-EK-Gemisch in den Eppendorfreaktionsgefäßen wird in einem Wärmeblock bei 37° C inkubiert, der zur Gewährleistung einer andauernden guten Durchmischung auf einen Taumeltisch gestellt wird.

2.5. Blutausstriche

Nach 0,10,30,60 und 90 Min. Inkubationszeit werden vom Leerwert A und Testansatz B,C je 3 Blutausstriche A,B,C hergestellt.

2.6. Enterokokkenkulturen

Aus Testansatz C wird nach 0,30,60 und 90 Min. Inkubationszeit eine Verdünnungsreihe in 3 Schritten mit der Gesamtverdünnung 1:6600 hergestellt. Bei Annahme von etwa 10 Mio. EK in Testansatz C enthalten somit 50µl der 0-Min.-Endverdünnung ca. 75 EK.

Verdünnung mit Aqua dest. bewirkt, daß die Granulocyten platzen und somit auch bereits phagocytierte, aber noch vermehrungsfähige EK erfaßt werden.

Nach 30,60 und 90 Min. werden jeweils 50,100,200 und 400µl, nach 0 Min. zweimal 50 und 200µl (Doppelbestimmung) der entsprechenden Endverdünnungen in 4 Petrischalen pipettiert, mit flüssigem Nähragar übergossen, gut durchmischt und bei 37° C 18h inkubiert.

Durch Auszählen der sichtbaren EK-Kolonien in den Petrischalen nach 18h erhält man die 0-,30-,60- und 90-Min.-Werte.

Der mit dem entsprechenden Verdünnungsfaktor umgerechnete Durchschnittswert der 0-Min.-Werte(200µl) ergibt die EK-Zahl in Testansatz C, damit auch in Testansatz B. Die EK-Zahl in Testansatz C(B) ist bereits aus 2.4. bekannt. Aus beiden Werten wird der Mittelwert der EK-Zahl in Testansatz C(B) gebildet.

Bei der Berechnung des EK/SNG-Verhältnisses in Testansatz C(B) wird jeweils der auf diese Weise errechnete Mittelwert der EK-Zahl im entsprechenden Testansatz C(B) zugrundegelegt.

Der Enterokokkenabtötungstest wird an 3 Vergleichspersonen und 4 Patienten durchgeführt.

2.7. Färbung der Blutausstriche

Färbung der Blutausstriche A,B,C mit PIC(siehe 1.2.) ergibt die Präparate A,B,C.

2.8. Mikroskopieren der Präparate unter dem Fluoreszenzmikroskop

a) Bestimmung des Phagocytoseindexes(PI) bzw. 5 Enterokokken-Phagocytoseindexes(5 EK-PI) zur Beurteilung des Phagocytoseverhaltens von segmentkernigen neutrophilen Granulocyten:

In allen Präparaten werden jeweils 100 SNG ausgewertet. Nach Möglichkeit werden nur SNG berücksichtigt, die im dünnsten Ausstrichdrittel der Präparate liegen, da hier aufgrund einschichtig vorhandener Zelllagen eine fast fehlerfreie Zählung phagocytierter EK möglich ist. Die mit zunehmender Inkubationszeit am Präparatrand immer häufiger auftretenden Zellhaufen aus untergehenden SNG und angedauten EK bleiben bei der Auswertung unberücksichtigt, da in ihnen keine sichere gegenseitige Zuordnung von EK und SNG mehr möglich ist.
Da der PI(5 EK-PI) vom EK/SNG-Verhältnis abhängt (siehe IV), werden zur Bestimmung des PI(5 EK-PI) die Auswertungen der Präparate B oder C herangezogen, deren EK/SNG-Verhältnis vom EK/SNG-Verhältnis von 4,5 der im 1. Versuch zur Untersuchung gelangten Vergleichsperson am wenigsten abweicht.
Bei den Vergleichspersonen beträgt dabei das EK/SNG-Verhältnis in den zur Bestimmung des PI(5 EK-PI) berücksichtigten Präparaten(Testansätzen) 3,4 bis 5,7 , im Mittel 4,5 , bei den Patienten 3,2 bis 30, im Mittel 10,7.

b) Darstellung cytoplasmatischer Granula und Morphologie phagocytierter EK in den Präparaten A,B,C:
In 4.3.1. sind die Ergebnisse von 1500 bis 2000 ausgewerteten nicht-phagocytierenden SNG dargestellt.

In 4.3.2. und 4.4.2. sind die Ergebnisse von 6000 bis 8000 ausgewerteten phagocytierenden SNG dargelegt.
Die Auswertung der nicht-phagocytierenden bzw. phagocytierenden SNG von Vergleichspersonen und Patienten erfolgt dabei jeweils getrennt. Die Patienten- und Vergleichspersonenergebnisse dieses Versuchsteiles sind jedoch in 4.3. und 4.4.3. zusammengefaßt, da sie mit einer Ausnahme identisch sind. Diese Ausnahme ist an entsprechender Stelle vermerkt.

c) Gegebenenfalls photographische Dokumentation

3. Patientengut

Zur Untersuchung gelangen 8 Kinder(Patienten), deren gemeinsames Merkmal chronische Infekte sind, sowie 6 gesunde Erwachsene(Vergleichspersonen).
Die klinischen Daten der Kinder sind aus Tab. 1 (Seite 10) zu entnehmen.
Bei 3 Patientenversuchen wird gleichzeitig ein Kontrollversuch mit einer Vergleichsperson durchgeführt(siehe Tab.1).
Die Versuchsergebnisse der Patienten werden mit den Versuchsergebnissen der Vergleichspersonen verglichen.

Patient Alter (Jahre)	Klin. Diagnose	BKS	SNG / ml Blut (Mio.)	andere Befunde	Verhältnis EK/SNG in Testansatz B oder C, entspr. der Best. des PI in Präp. B oder C	
					Patient	gleichzeitige Kontrolle
H.D. 1,5 m	bakteriell superinfizierte Neurodermitis, rezidiv. Infekte d. oberen Luftwege	9	1,45		8,2	3,4
D.M. 2,5 m	Abszesse am Kopf Bronchitis		1,2	ß-hämolys. Streptok. Gr. A i. Abszeß	10	3,4
B.E. 15 w	juvenile Nephronophthise	44	2,6	Kreatinin: 9,o mg/100ml	8	5,7
B.C. 2 m	rezidiv. Infekte der oberen Luftwege	25	2,5		4,8	keine Kontr.
K.I. 5 m	adenoide Vegetationen	6	5,9 Mio. Leukoz.		20Mio. EK i. Testansatz B	"
B.B. 8 w	rezidiv. Infekte der oberen Luftwege	4	6,9		3,2	"
H.B. 15 w	Marfan-Syndrom	7	0,6	leichter IgM-Mangel IgM: 44,2 mg/100ml	30	"
L.N. m	Bronchitis					"

Tab.1: Klinische Daten der Kinder

m = männlich
w = weiblich
BKS-Werte: Nach 1 Stunde

4. Versuchsergebnisse

4.1. Phagocytoseverhalten von segmentkernigen neutrophilen Granulocyten mit Enterokokken

4.1.1. Phagocytoseindex(PI)

$$PI(tMin.) = \frac{\text{Zahl der SNG, die nach t Min. EK phagocytiert haben}}{\text{Gesamtzahl der nach t Min. ausgewerteten SNG}} \cdot 100\ \% \qquad (21)$$

a) PI der 6 Vergleichspersonen

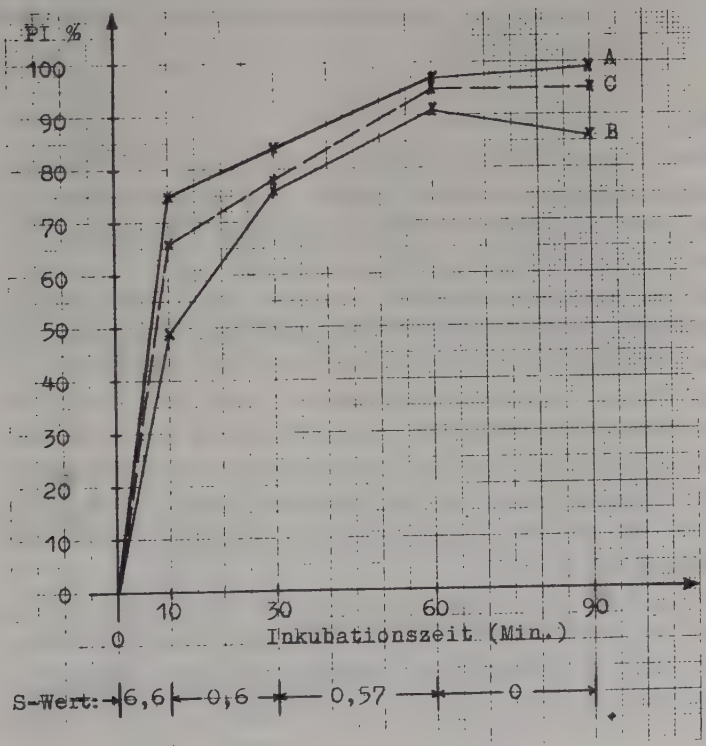

Abb. 2

zu Abb.2:

Kurve A: Vergleichsperson mit dem höchsten PI. Er beträgt 75,84,97 und 99% nach 10,30,60 und 90 Min. Inkubationszeit.

Kurve B: Vergleichsperson mit dem niedrigsten PI. Er beträgt 49,76,91 und 86% nach 10,30,60 und 90 Min. Inkubationszeit.

Kurve C: PI-Mittelwert der 6 Vergleichspersonen. Er beträgt 66,78,95 und 95% nach 10,30,60 und 90 Min. Inkubationszeit.

S-Wert: Steigung der Mittelwertkurve(Kurve C) bzw. Steigungsrate(Anstieg) des PI-Mittelwertes in %/Min. in den entsprechenden Inkubationsintervallen.

Ergebnisse von 4.1.1.a):

Der Bereich zwischen Kurve A und B entspricht der Schwankungsbreite des PI der 6 Vergleichspersonen. Sie beträgt zwischen 26% nach 10 Min. und 6% nach 60 Min. Inkubationszeit.

Im Inkubationsintervall(II) von 0 bis 10 Min. phagocytieren bereits 2/3 (S-Wert:6,6%/Min.) der ausgewerteten SNG der Vergleichspersonen Enterokokken.

Im II von 10 bis 30 Min. und im II von 30 bis 60 Min. beträgt der Anstieg des PI-Mittelwertes mit 0,6 bzw. 0,57%/Min. ungefähr 1/11 des anfänglichen Anstieges.

Der PI-Mittelwert der Vergleichspersonen hat mit 95% nach nur 60 Min. Inkubationszeit seinen größten Wert erreicht.

Der Abfall des PI in Kurve B im II von 60 bis 90 Min. kommt dadurch zustande, daß SNG nach Phagocytose von EK bereits nach 60 Min. Inkubationszeit untergehen können und dann nicht mehr ausgewertet werden(siehe 2.8.).

b) PI der 8 Patienten

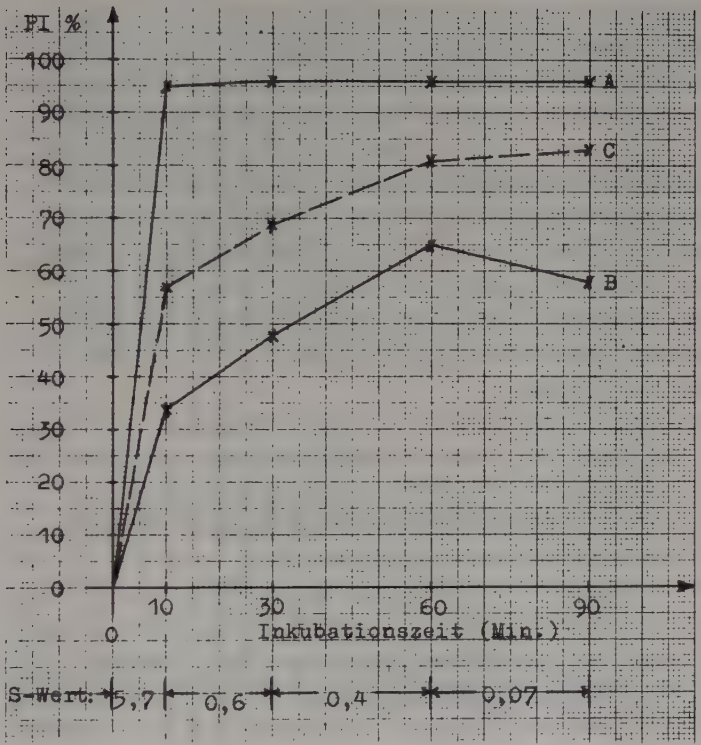

Abb. 3

Kurve A: Patient mit dem höchsten PI(D.M.). Er beträgt 95,96,96 und 96% nach 10,30,60 und 90 Min. Inkubationszeit.

Kurve B: Patient mit dem niedrigsten PI(K.I.). Er beträgt 34,48,65 und 58% nach 10,30,60 und 90 Min. Inkubationszeit.

Kurve C: PI-Mittelwert der 8 Patienten. Er beträgt 57, 69,81 und 83% nach 10,30,60 und 90 Min. Inkubationszeit.

S-Wert : Entsprechend wie in Abb. 2

Ergebnisse von 4.1.1.b):

Der Bereich zwischen Kurve A und B entspricht der Schwankungsbreite des PI der 8 Patienten. Sie beträgt zwischen 61% nach 10 Min. und 31% nach 60 Min. Inkubationszeit und ist damit gegenüber der Schwankungsbreite der Vergleichspersonen erheblich größer. Der PI von K.I. ist im gesamten Inkubationszeitraum von 90 Min. niedriger als der PI der Vergleichsperson mit dem niedrigsten PI. Der PI von D.M. ist im Inkubationszeitraum von 0 bis 30 Min. höher als der PI der Vergleichsperson mit dem höchsten PI.
Die PI-Mittelwertkurve von Vergleichspersonen und Patienten weisen im grundsätzlichen gleiches Steigungsverhalten auf:
Im II von 0 bis 10 Min. ist die Steigung der PI-Mittelwertkurve von Vergleichspersonen und Patienten mit 6,6 und 5,7%/Min. zwar unterschiedlich groß, aber jeweils die größte der Steigungen im gesamten Inkubationszeitraum von 90 Min.
Im II von 10 bis 30 Min. und im II von 30 bis 60 Min. steigt der PI-Mittelwert von Vergleichspersonen und Patienten mit annähernd derselben, aber ungefähr 11-fach geringeren Steigungsrate an.
Im II von 60 bis 90 Min. ist der Anstieg des PI-Mittelwertes von Vergleichspersonen und Patienten mit 0 und 0,07%/Min. unwesentlich.
Im gesamten Inkubationszeitraum von 90 Min. ist der PI von 7 Patienten niedriger, nur der PI von D.M. höher als der PI-Mittelwert der Vergleichspersonen.
Der PI-Mittelwert der oben genannten 7 Patienten(ohne D.M.) beträgt 51,65,79 und 81% nach 10,30,60 und 90 Min. Inkubationszeit.
Der PI-Mittelwert von 8(7) Patienten ist gegenüber dem PI-Mittelwert der Vergleichspersonen um 9(15),

9(13), 14(16) und 12(14)% nach 10,30,60 und 90 Min. Inkubationszeit erniedrigt. Im Inkubationszeitraum von 10 bis 90 Min. vergrößert(verkleinert) sich die Differenz des PI-Mittelwertes von Vergleichspersonen und 8(7) Patienten um 3(1)%.
Der Prozentsatz EK phagocytierender SNG ist also bei den oben genannten 7 Patienten im Durchschnitt nur im II von 0 bis 10 Min. geringer als beim Durchschnitt der Vergleichspersonen.
Bezüglich des Abfalles des PI in Kurve B im II von 60 bis 90 Min. siehe Erklärung in 4.1.1.a).

4.1.2. 5 Enterokokken(EK)-Phagocytoseindex(PI)

$$5\ \text{EK-PI(t Min.)} = \frac{\text{Zahl der SNG, die nach t Min. 5 oder mehr als 5EK phagocyt.haben}}{\text{Gesamtzahl der nach t Min. ausgewerteten SNG}} \cdot 100\%$$

a) 5 EK-PI der 6 Vergleichspersonen

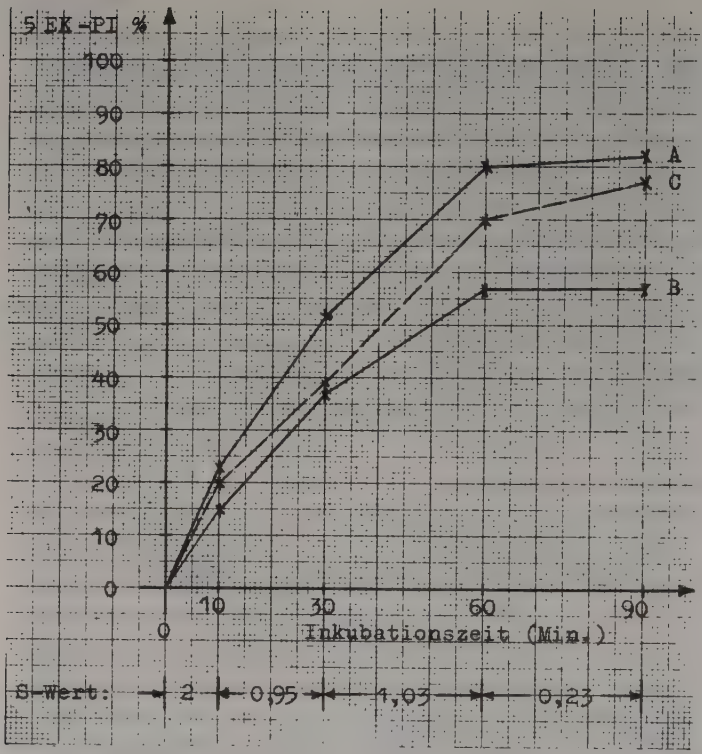

Abb. 4

Kurve A: Vergleichsperson mit dem höchsten 5 EK-PI. Er beträgt 23,52,80 und 82% nach 10,30,60 und 90 Min. Inkubationszeit.

Kurve B: Vergleichsperson mit dem niedrigsten 5 EK-PI. Er beträgt 15,37,57 und 57% nach 10,30,60 und 90 Min. Inkubationszeit.

Kurve C: 5 EK-PI-Mittelwert der 6 Vergleichspersonen. Er beträgt 20,39,70 und 77% nach 10,30,60 und 90 Min. Inkubationszeit.

S-Wert : Entsprechend wie in Abb. 2

Ergebnisse von 4.1.2.a):

Die Schwankungsbreite des 5 EK-PI der 6 Vergleichspersonen beträgt zwischen 25% nach 90 Min. und 8% nach 10 Min. Inkubationszeit. Das entspricht ungefähr der Schwankungsbreite des PI der 6 Vergleichspersonen.

Im II von 0 bis 10 Min. phagocytieren nur 2o%(S-Wert: 2,0%/Min.) der ausgewerteten SNG der Vergleichspersonen 5 oder mehr als 5 EK. Im II von 10 bis 30 Min. und im II von 30 bis 60 Min. beträgt der Anstieg des 5 EK-PI-Mittelwertes mit 0,95 bzw. 1,03%/Min. ungefähr 1/2 des anfänglichen Anstieges. Im II von 60 bis 90 Min. steigt der 5 EK-PI-Mittelwert noch um 7% an.

Die PI-und 5 EK-PI-Mittelwertkurve der Vergleichspersonen unterscheiden sich deutlich in ihrem grundsätzlichen Steigungsverhalten:

Im II von 0 bis 10 Min. ist die Steigung der 5 EK-PI-Mittelwertkurve 1/3 der Steigung der PI-Mittelwertkurve im II von 0 bis 10 Min..

Im II von 10 bis 30 Min., im II von 30 bis 60 Min. und insbesondere im II von 60 bis 90 Min. ist die Steigung der 5 EK-PI-Mittelwertkurve jedoch größer als die Steigung der PI-Mittelwertkurve in den entsprechenden II. Dementsprechend verringert sich die Differenz des PI- und 5 EK-PI-Mittelwertes der Vergleichspersonen von 46% nach 10 Min. auf 39,25 und 18% nach 30,60 und 90 Min. Inkubationszeit.

Kurve A und B in Abb. 2 und 4 stammen von derselben Vergleichsperson.

Insgesamt besteht eine positive Korrelation zwischen dem PI und 5 EK-PI der 6 Vergleichspersonen.

b) 5 EK-PI der 8 Patienten

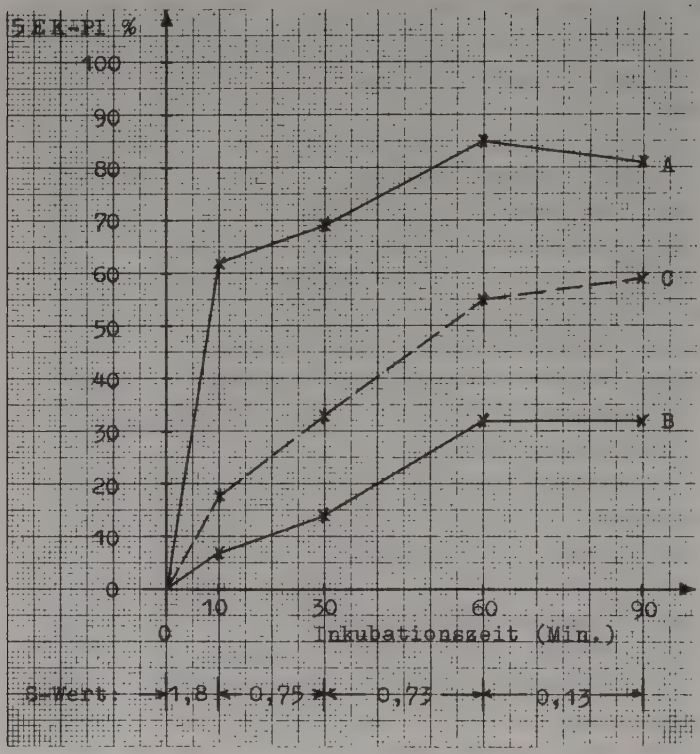

Abb. 5

Kurve A: Patient mit dem höchsten 5 EK-PI(D.M.). Er beträgt 62,69,85 und 81% nach 10,30,60 und 90 Min. Inkubationszeit.

Kurve B: Patient mit dem niedrigsten 5 EK-PI(K.I.). Er beträgt 7,14,32 und 32% nach 10,30,60 und 90 Min. Inkubationszeit.

Kurve C: 5 EK-PI-Mittelwert der 8 Patienten. Er beträgt 18,33,55 und 59% nach 10,30,60 und 90 Min. Inkubationszeit.

S-Wert : Entsprechend wie in Abb. 2

Ergebnisse von 4.1.2.b):

Die Schwankungsbreite des 5 EK-PI der 8 Patienten beträgt zwischen 55% nach 10 und 30 Min. und 49% nach 90 Min.. Das entspricht ungefähr der Schwankungsbreite des PI der 8 Patienten. Der 5 EK-PI von K.I. ist im gesamten Inkubationszeitraum von 90 Min. niedriger als der 5 EK-PI der Vergleichsperson mit dem niedrigsten 5 EK-PI. Der 5 EK-PI von D.M. ist im Inkubationszeitraum von 0 bis 60 Min. höher als der 5 EK-PI der Vergleichsperson mit dem höchsten 5 EK-PI.

Die 5 EK-PI-Mittelwertkurve von Vergleichspersonen und Patienten weisen im grundsätzlichen gleiches Steigungsverhalten auf:

Die Steigung der 5 EK-PI-Mittelwertkurve der Patienten ist aber darüberhinaus im gesamten Inkubationszeitraum von 90 Min. kleiner als die Steigung der 5 EK-PI-Mittelwertkurve der Vergleichspersonen(siehe S-Werte in Abb. 4 und 5).

Demgegenüber weisen die PI-Mittelwertkurve von Vergleichspersonen und Patienten im Rahmen ihres im grundsätzlichen ebenso gleichen Steigungsverhaltens wesentliche Steigungsunterschiede nur im II von 0 bis 10 Min. auf(siehe 4.1.1.b).

Der 5 EK-PI von 6 Patienten ist im gesamten Inkubationszeitraum von 90 Min. niedriger, der 5 EK-PI von H.B. im II von 30 bis 60 Min. und 60 bis 90 Min. höher, der 5 EK-PI von D.M. im gesamten Inkubationszeitraum von 90 Min. höher als der 5 EK-PI-Mittelwert der 8 Vergleichspersonen.

Der 5 EK-PI-Mittelwert der oben genannten 6 Patienten (ohne H.B. und D.M.) beträgt 12,26,45 und 52% nach 10,30,60 und 90 Min. Inkubationszeit.

Der 5 EK-PI-Mittelwert von 8(6) Patienten ist gegenüber dem 5 EK-PI-Mittelwert der Vergleichspersonen um 2(8),6(13),15(25) und 18(25)% nach 10,30,60 und

90 Min. Inkubationszeit erniedrigt. Im Inkubationszeitraum von 10 bis 90 Min. vergrößert sich die Differenz des 5 EK-PI-Mittelwertes von Vergleichspersonen und 8(6) Patienten um 16(17)%. Demgegenüber verkleinert sich die Differenz des PI-Mittelwertes von Vergleichspersonen und 7 Patienten im Inkubationszeitraum von 10 bis 90 Min. um 1.
Der Prozentsatz 5 oder mehr als 5 EK phagocytierender SNG ist also bei den oben genannten 6 Patienten im Durchschnitt im Inkubationszeitraum von 0 bis 60 Min. geringer als beim Durchschnitt der Vergleichspersonen, wobei 48, 32 und 20% dieses geringeren Prozentsatzes auf das II von 30 bis 60 Min., 0 bis 10 Min. und 10 bis 30 Min. entfallen.
Die PI- und 5 EK-PI-Mittelwertkurve der Patienten unterscheiden sich ähnlich deutlich in ihrem grundsätzlichen Steigungsverhalten, wie dies in 4.1.2.a) bereits für die entsprechenden Mittelwertkurven der Vergleichspersonen ausgeführt wurde. Dementsprechend verringert sich die Differenz des PI-und 5 EK-PI-Mittelwertes der Patienten von 39% nach 10 Min. auf 36, 26 und 24% nach 30,60 und 90 Min. Inkubationszeit. Die Verringerung der Differenz ist bei den Patienten kleiner als bei den Vergleichspersonen(siehe 4.1.2.b).
Bei Betrachtung der in Abb. 2 bis 5 dargestellten 4 Mittelwertkurven fällt auf, daß jeweils die Steigung im II von 10 bis 30 Min. annähernd gleich der Steigung im II von 30 bis 60 Min. ist. Die Steigung jeder PI-(5 EK-PI-)-Mittelwertkurve von Vergleichspersonen und Patienten darf im II von 10 bis 60 Min. als konstant angesehen werden.
Bezüglich des Abfalles des PI in Kurve A im II von 60 bis 90 Min. siehe Erklärung in 4.1.1.a).
Kurve A und B in Abb. 3 und 5 stammen von denselben Patienten D.M. bzw. K.I..
Insgesamt besteht eine positive Korrelation zwischen dem PI und dem 5 EK-PI der 8 Patienten.

4.1.3. Patientenversuch mit gleichzeitigem Kontrollversuch(siehe Tab. 1)

a) B.E./Kontrolle

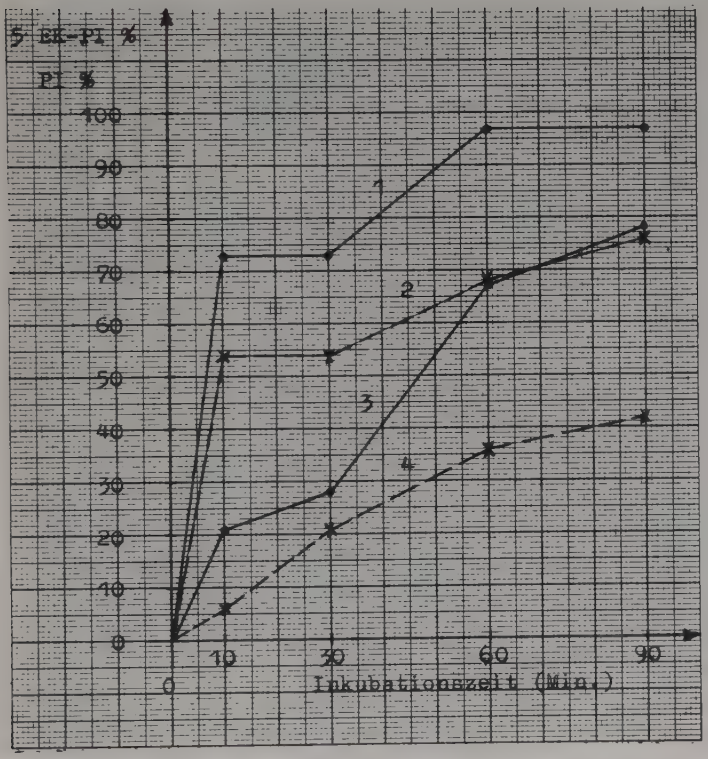

Abb. 6

Kurve 1: PI der Kontrolle
Kurve 2: PI von B.E.
Kurve 3: 5 EK-PI der Kontrolle
Kurve 4: 5 EK-PI von B.E.

b) H.D./Kontrolle

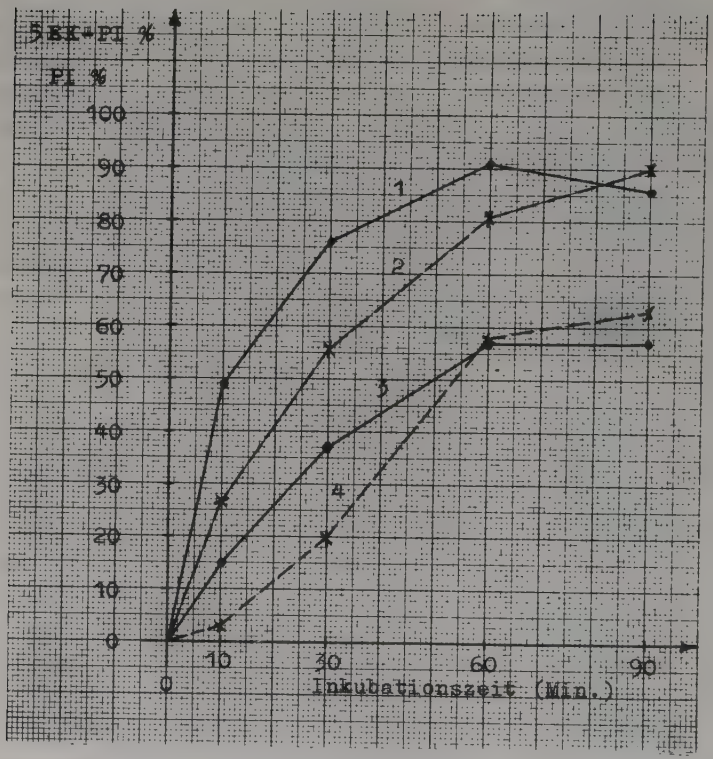

Abb. 7

Kurve 1: PI der Kontrolle(entspricht Kurve B in Abb. 2)

Kurve 2: PI von H.D.

Kurve 3: 5 EK-PI der Kontrolle(entspricht Kurve B in Abb. 4)

Kurve 4: 5 EK-PI von H.D.

Ergebnisse von 4.1.3.a):

B.E. ist an einer juvenilen Nephronophthise erkrankt und weist ein Kreatinin von 9mg/100ml auf.
Der PI(5 EK-PI) der Kontrolle weicht vom PI-(5 EK-PI-)-Mittelwert der 6 Vergleichspersonen um maximal 7(1)% nach oben und maximal 5(11)% nach unten ab.
Der PI(5 EK-PI) von B.E. ist gegenüber dem PI(5 EK-PI) der Kontrolle um 21(36)% nach 90 Min. Inkubationszeit sehr deutlich erniedrigt. Nach 90 Min. Inkubationszeit hat sich die Differenz des PI von der Kontrolle und B.E. um nur 2% auf 21% vergrößert, die entsprechende 5 EK-PI-Differenz aber um 21% auf 36% vergrößert.
Der PI(5 EK-PI) von B.E. ist auch gegenüber dem PI-(5 EK-PI-)Mittelwert der 8 Patienten um 7(17)% nach 90 Min. Inkubationszeit erniedrigt.

Ergebnisse von 4.1.3.b):

H.D. ist an einer bakteriell superinfizierten Neurodermitis und rezidivierenden Infekten der oberen Luftwege erkrankt.
Der PI(5 EK-PI) der Kontrolle ist der niedrigste von allen PI(5 EK-PI) der 6 Vergleichspersonen(siehe Kurve B in Abb. 2).
Trotzdem ist der PI(5 EK-PI) von H.D. gegenüber dem PI(5 EK-PI) der Kontrolle um 22(12)% bzw. 20(17)% nach 10 bzw. 30 Min. Inkubationszeit deutlich erniedrigt.
Im Inkubationszeitraum von 30 bis 90 Min. verkleinert sich die Differenz des PI(5 EK-PI) von der Kontrolle und H.D. zunehmend. Nach 90 Min. Inkubationszeit ist der PI(5 EK-PI) von H.D. sogar um 4(6)% gegenüber dem PI(5 EK-PI) der Kontrolle leicht erhöht.
Der PI(5 EK-PI) von H.D. ist gegenüber dem PI-(5 EK-PI-)-Mittelwert der 8 Patienten um 30(13)% bzw. 13(13)% nach 10 bzw. 30 Min. Inkubationszeit zum Teil noch deutlicher erniedrigt, nach 90 Min. Inkubationszeit jedoch um 7(4)% wiederum leicht erhöht.

c) D.M./Kontrolle

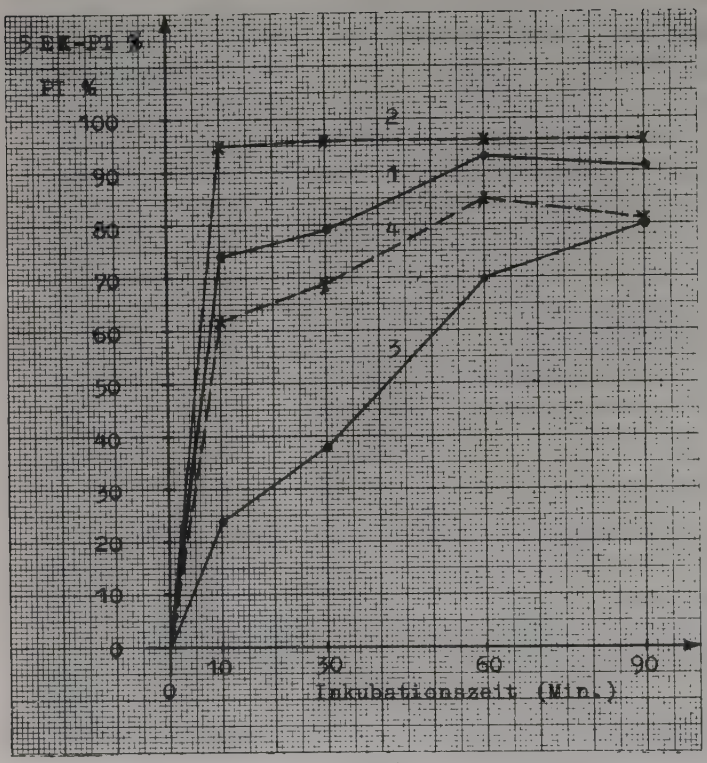

Abb. 8

Kurve 1: PI der Kontrolle
Kurve 2: PI von D.M.(entspricht Kurve A in Abb. 3)
Kurve 3: 5 EK-PI der Kontrolle
Kurve 4: 5 EK-PI von D.M.(entspricht Kurve A in Abb. 5)

Ergebnisse von 4.1.3.c):

D.M. ist an einer Bronchitis und Abszessen am Kopf, verursacht durch ß-hämolysierende Streptokokken der Gruppe A, erkrankt.
Der PI(5 EK-PI) der Kontrolle weicht von dem PI-(5 EK-PI-)Mittelwert der 6 Vergleichspersonen um maximal 8(4)% nach oben und maximal 4(1)% nach unten ab.
Der PI(5 EK-PI) von D.M. ist gegenüber dem PI(5 EK-PI) der Kontrolle um 21(38)% nach 10 Min. Inkubationszeit sehr deutlich erhöht. Im Inkubationszeitraum von 10 bis 90 Min. verkleinert sich die Differenz des PI(5 EK-PI) von der Kontrolle und D.M. zunehmend. Nach 90 Min. Inkubationszeit ist der PI (5 EK-PI) von D.M. um 5(1)% noch leicht erhöht gegenüber dem PI(5 EK-PI) der Kontrolle.
Der PI(5 EK-PI) von D.M. übertrifft alle PI(5 EK-PI) der 8 Patienten. Der PI von D.M. ist im Inkubationszeitraum von 0 bis 30 Min. höher als der PI der Vergleichsperson mit dem höchsten PI. Der 5 EK-PI von D.M. ist im Inkubationszeitraum von 0 bis 60 Min. höher als der 5 EK-PI der Vergleichsperson mit dem höchsten 5 EK-PI.

4.2. Enterokokkenabtötungstest

		7 Versuchspersonen						
		3 Vergleichs-personen(VP)			4 Patienten			
		1.VP	2.VP	3.VP	B.B.	B.E.	B.C.	H.D.
0-Min.-Wert(50µl)		64	31	82	36	75	77	88
0-Min.-Wert(200µl)		325	125	302	195	232	274	352
30-Min.-Wert(200µl)		75	51	145	63	152	75	234
60-Min.-Wert(200µl)		1	10	92	23	40	3	43
90-Min.-Wert(200µl)		3	5	18	6	48	3	195
%EK nach 90 Min.		0,9	3,7	6	3,1	21	1	55
Mittelwert %		3,5			8,3			-
PI % nach	30 Min.	84	74	81	63	54	73	56
	60 Min.	97	96	93	85	68	79	81
	90 Min.	99	100	94	83	76	83	90

Tab. 2

zu Tab. 2(siehe 2.6.):

0-Min.-Wert(50µl): Mittelwert der Doppelbestimmung. Die pipettierte Menge der Verdünnung aus Testansatz C beträgt 50µl(enthält rechnerisch ca. 75 EK).

0-Min.-Wert(200µl): Mittelwert der Doppelbestimmung. Die pipettierte Menge der Verdünnung aus Testansatz C beträgt 200µl(enthält rechnerisch ca. 300 EK).

%EK nach 90 Min.: Zahl der nach 90 Min. Inkubation noch vermehrungsfähigen EK in % des 0-Min.-Wertes(200µl).

Die 30-,60- und 90-Min.-Werte bei Pipettierung von 50, 100 und 400µl erscheinen nicht in Tab. 2.

Ergebnisse aus Tab. 2 und weitere nicht in Tab. 2 aufgeführte Ergebnisse:

1) Genauigkeit der Doppelbestimmung der O-Min.-Werte

a) O-Min.-Wert(50µl):

Die Differenz der doppelt bestimmten Werte betragt bei den 7 Versuchspersonen zwischen 264.000 und 2.772.000 EK.
Der Fehler bei der Bestimmung der EK-Zahl in Testansatz C betragt bei Pipettierung von 50µl im Durchschnitt 1.254.000 EK.

b) O-Min.-Wert(200µl):

Die Differenz der doppelt bestimmten Werte beträgt bei den 7 Versuchspersonen zwischen 264.000 und 2.640.000 EK.
Der Fehler bei der Bestimmung der EK-Zahl in Testansatz C beträgt bei Pipettierung von 200µl im Durchschnitt 957.000 EK.

2) Abnahme der vermehrungsfahigen EK:

Bei den Vergleichspersonen bleiben nach 90 Min. Inkubationszeit 0,9, 3,7 und 6%, im Durchschnitt 3,5% der EK vermehrungsfahig.
Bei den Patienten(ohne H.D.) bleiben nach 90 Min. Inkubationszeit 1, 3,1 und 21%, im Durchschnitt 8,3% der EK vermehrungsfahig.
Im Inkubationszeitraum von 0 bis 60 Min. vermindert sich bei allen 7 Versuchspersonen die Zahl der vermehrungsfahigen EK laufend. Der 90-Min.-Wert aber ist gegenüber dem 60.-Min.-Wert nur noch bei 3 Versuchspersonen(2.VP, 3.VP. B.B.) erniedrigt.
Die Abnahme der vermehrungsfahigen EK ist bei 6 Versuchspersonen im Inkubationsintervall von 30 bis 60 Min., bei 2 Versuchspersonen im Inkubationsintervall von 0 bis 30 Min. am größten.

4.3. Darstellung der cytoplasmatischen Granula von segmentkernigen neutrophilen Granulocyten

4.3.1. Fluoreszenzoptische Unterscheidung von 2 Granulatypen in nicht-phagocytierenden segmentkernigen neutrophilen Granulocyten und weitere Merkmale nicht-phagocytierender segmentkerniger neutrophiler Granulocyten.

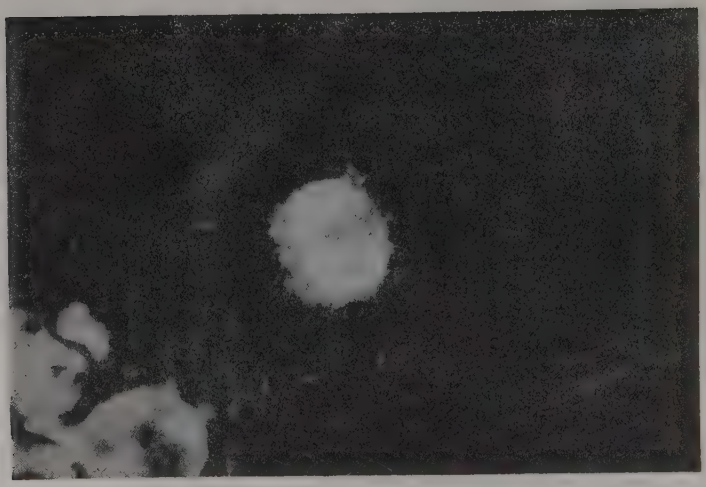

Abb. 9: Nicht-phagocytierender SNG

Der SNG in Abb. 9 zeigt folgende Merkmale:

1. Einen leuchtend hell-bis dunkelgelb fluoreszierenden Zellkern.
2. Ein unscharf begrenztes Cytoplasma im Gegensatz zur Mehrzahl der SNG, deren Cytoplasma scharf begrenzt ist.

3. Eine üppige Granulierung des Cytoplasmas, bestehend aus

a) großen Granula:

Sie zeigen eine leuchtend hell-bis dunkelgelbe, oft rötlich-gelbe Fluoreszenz.
Sie sind bei 1200-facher Vergrößerung sandkorngroß, rund, einzeln erkennbar und in vielen SNG noch zählbar.
Der SNG in Abb. 9 weist besonders am Cytoplasmarand typische große Granula auf.

b) kleinen Granula:

Sie stellen sich als flächenhaft grüner über das ganze Cytoplasma ausgebreiteter Fluoreszenzschleier dar.
Sie sind auch bei 1200-facher Vergrößerung nicht einzeln erkennbar.
Ihre schwache grüne Fluoreszenz wird oft von der intensiveren gelben Fluoreszenz der großen Granula überstrahlt.
Der SNG in Abb. 9 weist den grünen Fluoreszenzschleier der kleinen Granula besonders deutlich am linken unteren und rechten oberen Cytoplasmarand auf.

4.3.2. Degranulierung und weitere morphologische Veränderungen phagocytierender segmentkerniger neutrophiler Granulocyten(siehe Abb. 11).

1. Die Zellkerne sind zusehends deformiert.
2. Die Cytoplasmagrenzen verschwinden.
3. Die Zahl der cytoplasmatischen Granula nimmt ab (Degranulierung):

Die Degranulierungsrate ist proportional zur Phagocytoserate.
Die Degranulierung nach t Min. ist proportional

zur Zahl der nach t Min. vom SNG phagocytierten EK.
Der grüne Fluoreszenzschleier der kleinen Granula ist schon kurze Zeit nach Phagocytosebeginn nicht mehr zu erkennen.
Nach 90 Min. Inkubationszeit sind in allen SNG noch mindestens einige, oft noch viele große Granula zu erkennen.
Die Degranulierung der SNG der Patienten ist quantitativ vermindert gegenüber der Degranulierung der SNG der Vergleichspersonen(siehe 2.8.b).

4. Im Cytoplasma entstehen zusehends Vakuolen, die fluoreszenzoptisch schwarz erscheinen.
5. Alle diese Veränderungen zeigen den beginnenden Untergang phagocytierender SNG an. Die mit zunehmender Inkubationszeit am Präparatrand immer häufiger auftretenden Zellhaufen bestehen aus untergehenden SNG und angedauten EK.

4.4. Vergleich der Morphologie nicht-phagocytierter und phagocytierter Enterokokken

4.4.1. Morphologie nicht-phagocytierter Enterokokken

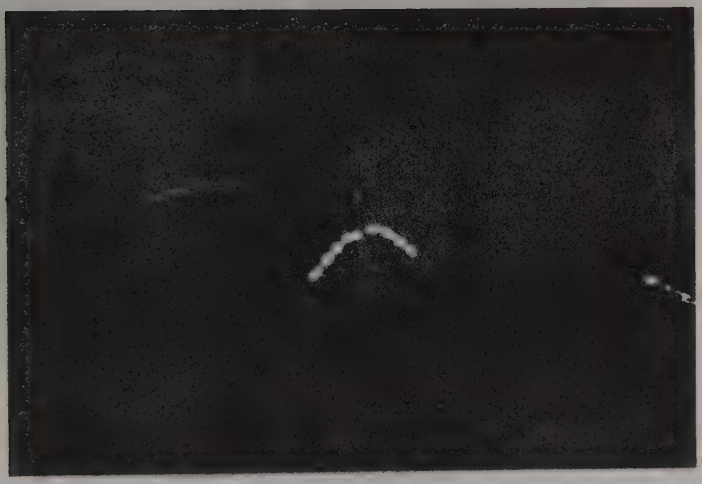

Abb. 1o: Kette nicht-phagocytierter EK

EK sind oval, selten rund und zeigen eine leuchtend hell- bis dunkelgelbe Fluoreszenz.
In der Neubauer-Zählkammer(siehe 2.2.) und in allen mikroskopierten Präparaten treten die EK meist paarig, selten einzeln auf. Das Auftreten der EK in Ketten wie in Abb. 10 ist die Ausnahme.

4.4.2. Verdauungserscheinungen an phagocytierten Enterokokken

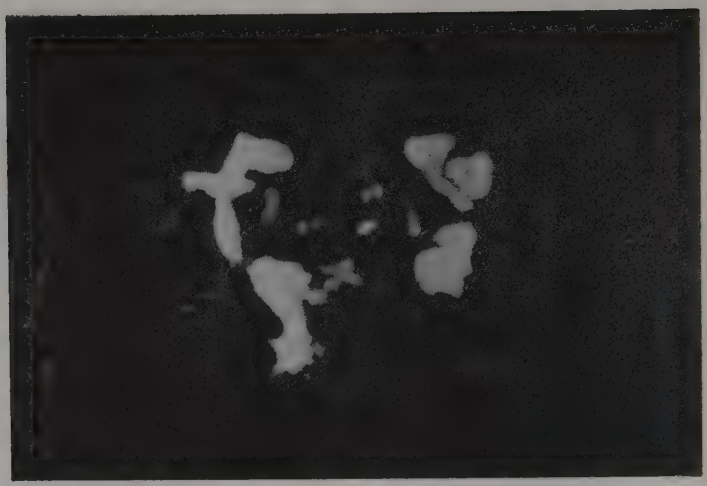

Abb. 11: 4 bereits sehr veränderte SNG mit ca. 20 phagocytierten und unterschiedlich stark angedauten EK nach 90 Min. Inkubationszeit.

1. Veränderungen der Gestalt der EK

a) Zunächst Größenzunahme(Auftreibung, Quellung) der EK durch Einwirkung des Granulainhaltes:

Die Größenzunahme führt zum Erscheinungsbild kreisrunder, ballonartig gequollener oder zylinderförmig aufgetriebener EK.
Durch die Vergrößerung erreichen die angedauten EK maximal die 3- bis 4-fache Größe nichtphagocytierter EK.

In Abb. 11 erkennt man in der Mitte 1 EK-Paar ohne sichtbare Verdauungserscheinungen, rechts daneben 1 EK-Paar mit der typischen ballonartigen Quellung, ganz links oben 1 EK-Paar mit der typischen zylinderförmigen Auftreibung.

b) Abschließend Größenabnahme und vollständiges Verschwinden der EK in den Vakuolen:

Die gequollenen EK platzen oder lösen sich in kleine Bruchstücke auf, die in den Vakuolen noch längere Zeit zu erkennen sind.
Eine einheitliche Form dieser Bruchstücke kann nicht beschrieben werden.
In Abb. 11 erkennt man oben und in der Mitte der großen Verdauungsvakuole je 1 Paar sich auflösender bzw. Bruchstücke geplatzter EK.

c) An gepaarten EK beobachtet man an der ursprünglichen Verbindungsstelle häufig eine breite Spaltbildung. In Abb. 11 erkennt man oben in der Mitte 1 EK-Paar mit einer Spaltbildung.

2. Veränderungen der Fluoreszenz der EK

a) Wechsel der Fluoreszenzfarbe:

Anstelle der gelben Fluoreszenz der nicht-phagocytierten EK zeigen mäßig vergrößerte (kreisrunde) EK im Inneren und Bruchstücke von EK im gesamten eine rötlich-braune Fluoreszenz, stark vergrößerte (zylinderförmige) EK im gesamten eine mehr grünliche Fluoreszenz.
Die Konturen vor allem mäßig vergrößerter (kreisrunder) EK zeigen meistens weiterhin gelbe Fluoreszenz.

b) Intensitätsverlust der Fluoreszenz:

Die Intensität der Fluoreszenz angedauter EK ist stets schwächer verglichen mit der Intensitat nicht-phagocytierter EK.

IV. Diskussion

Die Phagocytoseleistung(Prozentsatz phagocytierender SNG bzw. Zahl phagocytierter EK/SNG) von SNG wird mit der Zahl der ihnen zur Verfügung stehenden Bakterien größer, hängt also vom Bakterien(EK)/SNG-Verhältnis ab(1,14,22,26). Eine möglichst genaue Bestimmung der EK-Zahl in der EKBM bzw. in den Testansätzen ist notwendig, weil ein möglichst gleiches EK/SNG-Verhältnis in den einzelnen Versuchen die Voraussetzung eines sinnvollen Vergleichs der Phagocytoseleistungen von Vergleichspersonen und Patienten ist. Bei der Bestimmung der EK-Zahl in Testansatz C mit Hilfe von EK-Kulturen beträgt der Fehler im Durchschnitt $1{,}2 \cdot 10^6$ EK, mit Hilfe der Zählkammer $4{,}8 \cdot 10^6$ EK. Der Fehler der Zählkammermethode wird durch die aktive und passive Bewegung der EK in der Zählkammer verursacht, die ein genaues Zuordnen der EK zu den Quadraten des Zählnetzes nicht immer möglich macht. Außerdem können Schmutzteilchen mit EK verwechselt werden. Beträgt die Differenz der beiden Durchschnittswerte EK/großes Eckquadrat 1, entspricht dies bereits einer Differenz von $1{,}6 \cdot 10^8$ EK/ml EKBM. Die mit der Zählkammer ermittelte EK-Zahl in Testansatz C ist im Durchschnitt um einige Mio. höher gegenüber der mit EK-Kulturen ermittelten EK-Zahl im entsprechenden Testansatz C.
Die EK-Menge in Testansatz C lässt sich mit Hilfe von EK-Kulturen genauer bestimmen als mit der Zählkammermethode. Mit Hilfe von EK-Kulturen kann die mit der Zählkammermethode errechnete EK-Menge in der EKBM bzw. Testansatz C(B) überprüft werden. Bei der Berechnung des EK/SNG-Verhältnisses in Testansatz B bzw. C wird der Mittelwert der mit beiden Methoden errechneten EK-Zahl in Testansatz B bzw. C zugrundegelegt.

Alle Versuche wurden mit Vollblut durchgeführt. Im Gegensatz dazu trennen viele Untersucher die Leukocyten ab, waschen sie und geben dann Fremdserum dazu. 1973 wurde nachgewiesen, daß Erythrocyten die bakterizide Wirkung von Leukocyten in diesbezüglichen Funktionstesten nicht beeinflussen(5). Auch Seebach führte seine Versuche mit Vollblut durch, da er jeglichen Einfluß der für die Abtrennung von Leukocyten erforderlichen Substanzen auf Zell-,Phagosomen- und Lysosomenmembranen und den Zellstoffwechsel ausschließen wollte. Gleichzeitig wollte er dadurch eventuelle mechanische Alterationen an den Leukocyten, zum Beispiel durch Zentrifugieren und Resuspendieren während ihrer Abtrennung, vermeiden(25).

Das normale Phagocytoseverhalten menschlicher SNG mit EK zeigt Abb. 2 und 4. Das wichtigste Merkmal der PI-Mittelwertkurve in Abb. 2 ist ihre große Steigung im II von 0 bis 10 Minuten. Bereits 2/3 der SNG der Vergleichspersonen haben nach 10 Min. Inkubationszeit EK phagocytiert. Die weitere Phagocytose von EK bis zu 5 und mehr geschieht dann bei 4/5 der SNG langsamer, wie aus den Steigungen der 5 EK-PI-Mittelwertkurve hervorgeht. Abb. 2 und 4 lassen allerdings erkennen, daß bei genügend langer Inkubationszeit und genügendem Angebot an EK der PI und 5 EK-PI einem gemeinsamen Wert zustreben. Es ist anzunehmen, daß die Phagocytose eines Bakteriums die Ingestion weiterer Bakterien zur Folge hat. Hitzig nennt es: "L'appetit vient en mangeant"(12). Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen beschrieb 1972 Solberg die größte Phagocytosetätigkeit von Leukocyten in der Anfangsphase der Inkubation und eine sehr geringe Phagocytosetätigkeit nach einer Stunde Inkubationszeit(26).

K.I., der an adenoiden Vegetationen erkrankt ist, weist

die niedrigsten PI(5 EK-PI) aller Versuchspersonen auf. 7 Patienten phagocytieren schlechter als der Durchschnitt der SNG der Vergleichspersonen. Der nach 90 Min. Inkubationszeit gegenüber dem PI-(5 EK-PI-)Mittelwert der Vergleichspersonen um 14(25)% erniedrigte PI-(5 EK-PI-) -Mittelwert von 7(6) Patienten hat seine Ursache in Opsonisierungsdefekten des Serums oder Phagocytosedefekten der SNG der Patienten. Die Vergrößerung der Differenz des 5 EK-PI-Mittelwertes von Vergleichspersonen und Patienten im Inkubationszeitraum von 10 bis 90 Min. um 17% läßt jedoch einen Opsonisierungsdefekt wahrscheinlicher erscheinen. Bei einem Phagocytosedefekt müsste sich im Inkubationszeitraum von 10 bis 90 Min. auch die Differenz der PI-Mittelwerte von Vergleichspersonen und Patienten vergrößern. Sie verkleinert sich aber im Inkubationszeitraum von 10 bis 90 Min. um 1. Das Verhalten des 5 EK-PI gegenüber dem PI könnte somit gegebenenfalls eine Unterscheidungsmöglichkeit zwischen Phagocytose- und Opsonisierungsdefekten darstellen. Diesbezügliche Aussagen können allerdings erst dann als statistisch fundiert betrachtet werden, wenn sie sich an einer größeren Zahl entsprechender Versuche bestätigen lassen. Die Bestätigung könnte dabei in Versuchen mit Normalseren und SNG mit bekannten Phagocytosedefekten bzw. normalen SNG und Seren mit bekannten Opsonisierungsdefekten erfolgen.
Das EK/SNG-Verhältnis der Patienten ist mit einem Mittel von 4,5 mehr als doppelt so hoch als das der Vergleichspersonen mit einem Mittel von 10,7(siehe 2.8.a). Daher ist anzunehmen, daß die Phagocytoseleistung der SNG der Patienten gegenüber der der Vergleichspersonen bei gleichem EK/SNG-Verhältnis noch niedriger ist als in 4.1. beschrieben.

Bei den Patientenversuchen mit gleichzeitigem Kontrollversuch ist die in die Testansätze pipettierte EK-Zanl jeweils gleich, vorausgesetzt, daß die EK in der EKBM homogen verteilt sind. Fehler bei der Zählung der EK beeinflussen die Ergebnisse nicht. Beim Vergleich der Kon-

trollergebnisse mit den Patientenergebnissen müssen nur die unterschiedlichen SNG-Zahlen berücksichtigt werden. B.E. ist an einer juvenilen Nephronophthise erkrankt und weist ein Kreatinin von 9mg/100 ml auf. Die Vergrößerung der Differenz des 5 EK-PI von Kontrolle und B.E. im Inkubationszeitraum von 10 bis 90 Min. um 21% - die entsprechende PI-Differenz bleibt im Inkubationszeitraum von 10 bis 90 Min. nahezu gleichweist wieder auf einen Opsonisierungsdefekt hin. Über eine verringerte Phagocytose bei Urämie wurde berichtet(8,18). H.D. ist an einer bakteriell superinfizierten Neurodermitis und rezidivierenden Infekten der oberen Luftwege erkrankt. Seine SNG weisen gegenüber den SNG der Kontrolle nur im Inkubationszeitraum von 0 bis 30 Min. eine stark verringerte Phagocytose auf. Die PI (5 EK-PI) der Kontrolle sind die niedrigsten aller PI (5 EK-PI) der Vergleichspersonen. Eine verringerte Phagocytose bei schwerer atopischer Dermatitis und in deren Folge häufige Hautinfektionen mit Staphylokokken und Streptokokken ist bekannt(17). D.M. ist an einer Bronchitis und akut auftretenden Abszessen am Kopf, verursacht durch ß-hämolysierende Streptokokken der Gruppe A, erkrankt. Seebach beschrieb 1974 einen Anstieg des PI im Verlaufe von akuten bakteriellen Infektionen(25). Auch Alexander und Stossel wiesen erhöhte Phagocytose nach bakteriellen Infektionen und anderen Grundkrankheiten nach(1,28;1.Teil). Es ist unwahrscheinlich, daß der gegenüber der Kontrolle erhöhte PI(5 EK-PI)von D.M. nur durch das höhere EK/SNG-Verhältnis bedingt ist. Forster (9) findet bei einer Vergrößerung des EK/SNG-Verhältnisses von 4 auf 10(EK/SNG-Verhältnis bei D.M. 10, bei der Kontrolle 3,4) einen Anstieg des PI von 0,5%/Min. auf 1,1%/Min., das entspricht einem Anstieg des PI um 6% nach 10 Min. Inkubationszeit. Der PI von D.M. ist nach 10 Min.

Inkubationszeit aber um 21% gegenüber dem PI der Kontrolle erhöht. Außerdem weisen andere Patienten mit einem ähnlich hohen bzw. höheren EK/SNG-Verhältnis niedere PI(5 EK-PI) auf.

H.D. weist im II von 60 bis 90 Min. normale PI auf, gleichzeitig aber auch einen sehr großen 90-Min.-Wert. Das bedeutet bei Ausschluß zufälliger Fehler, z.B. einer gegenüber den anderen Versuchspersonen sehr viel größeren EK-Menge in den Testansätzen, einen echten Anstieg der vermehrungsfähigen EK. Dieser Anstieg ist durch eine schlechte intrazelluläre Abtötung von EK durch die SNG von H.D. bedingt(1). Der deutlich erniedrigte PI von B.E. nach 90 Min. Inkubationszeit kommt auch in ihrem großen 90-Min.-Wert zum Ausdruck. Er resultiert aus einer größeren Menge extrazellulär vorhandener EK(1).
Der systematische Fehler der EK-Kulturen ist zu groß, um bei der Mehrzahl der Versuchspersonen noch eine zuverlässige Aussage über die Abnahme der vermehrungsfähigen EK im II von 60 bis 90 Min. treffen zu können. Eine geringe Zunahme des 90-Min.-Wertes gegenüber dem 60-Min.-Wert, z.B. bei B.E. und der 1. VP, kann entweder durch eine echte Zunahme der vermehrungsfähigen EK im II von 60 bis 90 Min. oder durch eine gegenüber dem systematischen Fehler zu geringen Abtötungsrate von EK im II von 60 bis 90 Min. verursacht sein. Dementsprechend kann eine geringe Abnahme des 90-Min.-Wertes gegenüber dem 60-Min.-Wert einer echten Abnahme der vermehrungsfähigen EK entsprechen, aber auch durch den systematischen Fehler bedingt sein.
Der PI von B.B. und B.C. ist gegenüber dem PI der 1. VP bzw. 2. VP um 16 bzw. 17% nach 90 Min. Inkubationszeit erniedrigt. Demgegenüber sind die 90-Min.-Werte von B.B., B.C., 1.VP und 2. VP mit 6,3,3 und 5 annähernd gleich. Der

systematische Fehler der EK-Kulturen ist wieder zu groß, um kleinere Phagocytoseunterschiede zwischen den SNG der Patienten und Vergleichspersonen, die in ihrem unterschiedlichen PI(5 EK-PI) noch deutlich zum Ausdruck kommen, erkennen zu lassen.

In den letzten Jahren ist mit recht unterschiedlichen Untersuchungsmethoden übereinstimmend eine Unterscheidung von 2 Granulatypen in menschlichen SNG gelungen (4,7). Alle Untersucher stellen große, primäre, azurophile Granula kleinen, sekundären, spezifischen Granula gegenüber. Das Vorkommen weiterer Granulatypen ist bis heute noch nicht gesichert. Die azurophilen Granula sind ungefähr 500µm groß(4), stellen sich in der Wright-Giemsa-Färbung blau(azurophil) dar und erscheinen ultrastrukturell elektronendicht(28:1.Teil). Sie werden nur in Promyelocyten als erste der Granula(primäre) gebildet und entstammen der inneren Oberfläche des Golgi-Apparates(4). Die enzymatische Ausstattung der primären Granula setzt sich aus bakteriziden Enzymen, nämlich Myeloperoxidase und Lysozym, und sauren Hydrolasen zusammen. Die sauren Hydrolasen sind wahrscheinlich Abbauenzyme für abgetötete Bakterien(2,23). Aufgrund dieser Enzymausstattung werden die azurophilen Granula mit primären Lysosomen gleichgesetzt(4). Die spezifischen Granula sind mit ca. 200µm Größe kleiner als die azurophilen Granula(4), lassen sich mit einer Wright-Giemsa-Färbung nur schwer anfärben und erscheinen ultrastrukturell weniger elektronendicht(28:1.Teil). Sie werden in Myelocyten gebildet(sekundär) und entstammen der äußeren Oberfläche des Golgi-Apparates(4). Die kleinen Granula beinhalten quantitativ weniger Enzyme als die azurophilen Granula und nur bakterizide, nämlich Lysozym und Lactoferrin(2,15). Der reife menschliche SNG enthält mehr spezifische als azurophile Granula. Ein Verhältnis von 2:1 wurde beschrieben(4). Im Verlauf der Phagocytose

von Bakterien oder anderen Partikeln durch SNG kommt es zu deren Degranulierung(10,11,28:2.Teil). Die Verschmelzung der Granula mit den Verdauungsvakuolen (Phagosome) erfolgt nacheinander, wobei die sekundären Granula mit den Phagosomen als erste verschmelzen(3). Mit Hilfe der hier angewandten Fluoreszenzfärbung kann in nicht-phagocytierenden SNG zwischen großen, leuchtend gelb fluoreszierenden und kleinen, grün fluoreszierenden Granula unterschieden werden. Sie entsprechen den in der Literatur beschriebenen azurophilen bzw. spezifischen Granula. Folgende Beobachtungen sprechen dafür, daß die gelb fluoreszierenden Granula den azurophilen, die grün fluoreszierenden den spezifischen Granula entsprechen:

1. Der grüne Fluoreszenzschleier der kleinen Granula kann in keinem Promyelocyten nachgewiesen werden.
2. Nach Phagocytose von EK durch SNG verschwindet immer rasch der grüne Fluoreszenzschleier der kleinen Granula.
3. Der grüne Fluoreszenzschleier der kleinen Granula kann nur deshalb wahrgenommen werden, weil die kleinen Granula die gelb fluoreszierenden Granula an Zahl weit übertreffen.
4. Der grüne Fluoreszenzschleier der kleinen Granula kann lichtmikroskopisch nicht mehr in einzelne grüne Fluoreszenzpunkte aufgelöst werden. Bainton weist bereits darauf hin, daß die spezifischen Granula mit ihrer Größe von ca. 200µm am Rande des Auflösungsvermögens des Lichtmikroskopes liegen. Bei seiner Färbung sind sie für die rosa Untergrundtönung der Neutrophilen während des Myelocytenstadiums und danach verantwortlich(4).
5. Die gelb fluoreszierenden Granula sind die größten darstellbaren Strukturen im Cytoplasma von SNG. Bretz beschreibt die azurophilen Granula als die

größten und dichtesten aller Komponenten der " post-nukleären Fraktion "(7).
Durch die Fluoreszenzfärbung von Blutausstrichen mit PIC können also gleichzeitig primäre und sekundäre Granula dargestellt werden. Alle bisher angewandten Granulafärbungen stellen entweder nur primäre oder nur sekundäre Granula dar. Der grüne Fluoreszenzschleier der kleinen Granula ist unter dem Fluoreszenzmikoskop sehr viel besser zu erkennen als in Abb. 9. Ein Bild ist immer schlechter als ein Negativ, ein Negativ immer schlechter als die direkte Beobachtung.

Die in 4.4.2. beschriebene anfängliche Größenzunahme (Auftreibung, Quellung) phagocytierter und im Verdauungsprozeß begriffener EK, begleitet von einem Wechsel der Fluoreszenzfarbe bei gleichzeitigem Intensitätsverlust der Fluoreszenz, ist auf die Wirkung des in primären und sekundären Granula von SNG enthaltenen Lysozyms auf phagocytierte EK zurückzuführen. Böhmer inkubierte PIC-gefärbte EK mit verschiedenen Lysozymkonzentrationen. Die daraufhin an EK darstellbaren Form- und Fluoreszenzveränderungen stimmen mit den in 4.4.2. beschriebenen weitgehend überein(6). Aufgrund der Ergebnisse des EK-Abtötungstestes darf von den in 4.4.2. beschriebenen spät auftretenden Form- und Fluoreszenzveränderungen an phagocytierten EK auf deren intrazelluläre Abtötung geschlossen werden. Es kann allerdings keine sichere Aussage darüber getroffen werden, ob die anfängliche Größenzunahme phagocytierter EK bereits mit ihrer Vermehrungsunfähigkeit einhergeht. Zur Klärung dieser Frage wäre es u.a. von Interesse zu wissen, welche Form-und Fluoreszenzveränderungen Bakterien erfahren, die vonSNG mit intrazellulären Abtötungsdefekten phagocytiert werden. Patienten mit progressiver septischer Granulomatose besitzen z.B. bei normalem Lysozymgehalt in den Granula einen intrazellulären Abtötungsdefekt für bestimmte Bakterienarten.

V. Zusammenfassung

Das wichtigste Ergebnis der vorliegenden Arbeit ist die gleichzeitige Darstellung und Unterscheidung primärer und sekundärer Granula in nicht-phagocytierenden segmentkernigen neutrophilen Granulocyten mit dem Fluoreszenzfarbstoff Pseudoisocyanin. Alle bisher angewandten Granulafärbungen stellen entweder nur primäre oder nur sekundäre Granula dar.

Daneben werden die Phagocytoseleistungen von 6 gesunden Erwachsenen(Vergleichspersonen) ermittelt und mit denen von 8 kranken Kindern(Patienten) verglichen. Der Phagocytoseindex-(5 Enterokokken-Phagocytoseindex-)Mittelwert der Patienten ist gegenüber dem Phagocytoseindex-(5 Enterokokken-Phagocytoseindex-)Mittelwert der Vergleichspersonen erniedrigt. Es kann gezeigt werden, daß die Ursache dafür mit einiger Sicherheit in Opsonisierungsdefekten des Serums der Patienten zu suchen ist. 2 Patienten mit Urämie bzw. schwerer atopischer Dermatitis weisen eine gegenüber der Kontrolle stark verringerte Phagocytose auf. 1 Patient mit akut auftretenden Abszessen am Kopf weist eine gegenüber der Kontrolle stark erhöhte Phagocytose auf.

Außerdem wird nachgewiesen, daß zur Erfassung kleinerer Phagocytoseunterschiede zwischen Patienten und Vergleichspersonen Enterokokkenkulturen aufgrund ihres großen systematischen Fehlers ungeeignet sind.

Insgesamt werden in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Pseudoisocyanin einige Abläufe und die entsprechenden morphologischen Korrelate von 4 Stadien der zellulären unspezifischen Abwehr(Phagocytose, Degranulierung, Abtötung der Bakterien, Tod der Granulocyten) beschrieben. Das Stadium der Opsonisierung kann indirekt mit Hilfe des Phagocytoseindexes(5 Enterokokken-Phagocytoseindexes) erfaßt und beurteilt werden.

Abkürzungen

EK	Enterokokken
EKBM	Enterokokken-Bouillon-Mischung
II	Inkubationsintervall(en)
PIC	Pseudoisocyanin
PI	Phagocytoseindex (es)
5 EK-PI	5 Enterokokken-Phagocytoseindex(es)
SNG	segmentkernige(r) neutrophile(r) Granulocyt(en)
VP	Vergleichsperson(en)

VI. Literaturverzeichnis

1. Alexander, J.W., Windhorst, D.B., Good, R.A.: Improved tests for the evaluation of neutrophil function in human disease. J.Lab.cl. Med. 72, 136-148(1968)

2. Baggiolini, M., Bretz, U., Gusus, B.: Biochemical characterization of azurophil and specific granules from human and rabbit polymorphonuclear leukocytes. Schweiz. med. Wschr. 1o4, 129-132(1974)

3. Bainton, D., F.: Sequential degranulation of the two types of polymorphonuclear leukocyte granules during phagocytosis of microorganisms. J.Cell.Biol. 58, 249-264(1973)

4. Bainton, D., F., Ullyot, L., J., Farquhar, G., M.: The development of neutrophilic polymorphonuclear leukocytes in human bone marrow. Origin and content of azurophil and specific granules. J.Exp. Med. 134, 907-934(1971)

5. Bannatyne, R.M., Umamaheswaran, B.: Miniaturization of leukocyte bactericidal function tests. Proc. of Soc. Exp. Biol. and Med. 143, 1034-1036(1973)

6. Böhmer, H.: Diss. in Vorbereitung. UNI München

7. Bretz, U., Baggiolini, M.: Biochemical and morphological characterization of azurophil and specific granules of human neutrophilic polymorphonuclear leukocytes. J.Cell Biol. 63, 251 - 269(1974)

8. Brogan, T.D.: Phagocytosis by polymorphonuclear leukocytes from patients with renal failure. Brit. Med. J. 1967 III, 596 - 599.

9. Forster, W.: Diss. in Vorbereitung. UNI München

10. Hirsch, J.G.: Cinemicrophotographic observations on granule lysis in polymorphoneclear leukocytes during phagocytosis. J.Exp. Med. 116, 827 - 835 (1962)

11. Hirsch, J.G., Cohn, Z.A.: Degranulation of polymorphonuclear leukocytes following phagocytosis of microorganisms. J.Exp. Med. 112, 1oo5 - 1o14 (196o)

12. Hitzig, W.M.: Gesunde und kranke Phagocytose: Theorie, Klinik und Laboratoriumsdiagnose. Triangel 12, 57 - 67(1973)

13. Keller, W.M.: Vergleichende fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen an Blut- und Knochenmarksausstrichen von Kindern. Diss. 1975. UNI München

14. Koch, C.: Neutrophil granulocyte function in vitro. Acta path. microbiol. scand. Section B. 82, 127 - 135(1974)

15. Leffell, M.S., Spitznagel, J.K.: Association of lactoferrin with lysozyme in granules of human polymorphonuclear leukocytes. Infection and Immunity 6, 761 - 765(1972)

16. Metschnikoff, E.: Untersuchungen über die mesodermalen Phagocyten einiger Wirbeltiere. Biol. Zentr. 3, 56o - 565(1883)

17. Michaëlsson, G.: Decreased phagocytic capacity of the neutrophil leukocytes in patients with atopic dermatitis. Acta Dermato-Venerologica 53, 279 - 282 (1973)

18. Montgomery, J.Z., Kalmanson, G.M., Guze, L.B.: Leukocyte phagocytosis and serum bactericidal activity in chronic renal failure. The Amer. J. of the Med. Sci. 264, 385 - 393(1972)

19. Niethammer, D., Wildfeuer, A., Kleihauer, E., Haferkamp, O.: Granulocytendysfunktion. I. Angeborene Störungen. Klin. Wschr. 53, 739 - 746 (1975)

2o. Niethammer, D., Wildfeuer, A., Kleihauer, E., Haferkamp, O.: Granulocytendysfunktion. II. Erworbene Störungen. Klin. Wschr. 53, 739 - 746 (1975)

21. Preisig, E., Hitzig, W.H.: Nitroblue-tetrazolium test for the detection of chronic granulomatous disease-technical modification. Europ. J. Clin. Invest. 1, 4o9 - 412(1971)

22. Sbarra, A.J., Shirley, W., Selvaraj, R.J., Ouchi, E., Rosenbaum, E.: The role of the phagocyte in host-parasite interactions. I. The phagocytic capabilities of leukocytes from lymphoproliferative disorders. Cancer Research 24 II, 1958 - 1968(1964)

23. Schiefer, H.-G.: Physiologie und Pathophysiologie der antibakteriellen Phagocytose. I. Physiologie. Med. Klin. 7o, 1615 - 1621(1975)

24. Schiefer, H.-G.: Physiologie und Pathophysiologie der antibakteriellen Phagocytose. II. Pathophysiologie. Med. Klin. 7o, 1622 - 1627(1975)

25. Seebach, G., Eschenbach, C.: Zur Entstehung cytoplasmatischer Vakuolen von Leukocyten im In-vitro-Versuch. I. Bildung cytoplasmatischer Vakuolen in Abhängigkeit von Entzündungsprozessen. Klin. Wschr. 52, II, 678 - 687 (1974)

26. Solberg, C.O.: Enhanced susceptibility to infection. Acta path. microbiol. scand. Section B. 8o, 1o - 18 (1972)

27. Solberg, C.O., Hellum, K.B.: Neutrophil granulocyte function in bacterial infections. The Lancet, October 7, 1972, 727 - 729

28. Stossel, P.T.: Medical progress: Phagocytosis. New Engl. J. Med. 290, 717 - 723(1. Teil), 774 - 78o (2. Teil), 833 - 839(3. Teil) (1974)

Herrn Prof. Dr. med. H.-J. Suschke gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas und die stets gewährte Unterstützung und Beratung bei der Durchführung der Arbeit.

Herrn Prof. Dr. med. H. Spiess danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes.

Herrn Prof. Dr. G. Scheibe danke ich für die Genehmigung, einen Teil der Arbeit am Institut für Physikalische Chemie der TU München ausführen zu dürfen.

Für wertvolle Hilfe bei vielen Arbeiten danke ich Frau G. Rode, Frau J. Ratkovic, Frau Ammerlahn und Herrn Wilhelm.

Zuletzt gilt mein Dank noch der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Übernahme der Materialkosten.

VII. Lebenslauf

Am 8.5.1953 wurde ich in Landsberg/Lech als Sohn des Uhrmachermeisters Anton Schleich und seiner Frau Theresia, geb. Osterried, geboren.

In Ludenhausen besuchte ich 6 Jahre die Volksschule. 1965 trat ich in die Realschule in Weilheim/Obb. ein. Nach erfolgreichem Abschluß wechselte ich 1969 in das mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium in Weilheim/Obb. über. 1973 legte ich dort die Reifeprüfung ab.

Seit dem WS 1973/74 studiere ich Humanmedizin an der Lud.-Max.-Universität München.